

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPOS DE BOTUCATU

Análise das relações da subfamília
Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae)
com base em seqüências de DNA
mitocondrial

ORIENTADO: FÁBIO FERNANDES ROXO
ORIENTADOR: DR. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Monografia apresentada ao
Departamento de Morfologia do
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

BOTUCATU/2008

FÁBIO FERNANDES ROXO

Análise das relações da subfamília
Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae)
com base em seqüências de DNA
mitocondrial

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Monografia apresentada ao
Departamento de Morfologia do
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

BOTUCATU/2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Roxo, Fábio Fernandes.

Análise das relações da subfamília Neoplecostominae (Siluriformes:
Loricariidae) com base em seqüências de DNA mitocondrial / Fábio
Fernandes Roxo. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Cláudio de Oliveira

1. Peixe - Genética 2. Filogenia 3. Genética

Palavras-chave: DNA mitocondrial; Filogenia; Neoplecostominae; Seqüências

Dedicada:

À busca do conhecimento do tesouro biológico, ao aumento do interesse da comunidade pela conservação biológica e à busca do entendimento da evolução.

Agradecimentos

- Agradeço a Deus primeiramente pelas oportunidades e por poder trilhar este caminho rumo ao futuro;

- Agradeço ao professor Dr. Claudio de Oliveira pela amizade de uma grande pessoa e pela orientação do caminho a seguir nessa jornada rumo à busca do conhecimento;

- Agradeço aos meus pais pelas portas que me abriram e pelas orientações do caminho a seguir nessa vida;

- Agradeço a Kelly, minha namorada, uma incrível mulher estando, sempre que preciso, ao meu lado. A própria história já provou que por trás de um grande homem sempre há uma grande mulher, assim, com ela ao meu lado tenho certeza que um dia me tornarei um grande homem;

- Agradeço ao Márcio César Chiachio, um grande amigo, um grande pesquisador e uma grande pessoa. Tudo que sei da área de pesquisa devo a ele. Sempre serei seu amigo e admirador;

- Agradeço aos meus amigos por sempre estarem comigo nas horas de bagunça e de trabalho, tenho certeza que todos seremos grandes pesquisadores e para sempre amigos.

Resumo

Os peixes se apresentam como um dos grupos com maior biodiversidade e com ampla distribuição pela superfície do planeta. O conhecimento desse grupo se faz necessário por sua importância ecológica e evolutiva e por ser uma das mais importantes fontes de proteína da alimentação humana. Numa tentativa de estabelecer um melhor conhecimento acerca das relações entre os representantes da subfamília Neoplecostominae o presente trabalho analisou o maior número possível de representantes deste grupo através de dois genes mitocondriais. Numa primeira parte, um estudo populacional englobando apenas o gênero *Neoplecostomus* (anteriormente o único da subfamília Neoplecostominae), permitiu verificar a existência de uma alta divergência genética entre alguns indivíduos de localidades isoladas. Com esse índice pôde-se estimar a possibilidade de ocorrência de novas espécies para este gênero na bacia do alto Paraná. Na segunda parte do trabalho a relação entre os representantes da subfamília Neoplecostominae foi determinada através de segmentos de dois genes mitocondriais o gene COI e o gene 16S. Os resultados permitiram a elaboração de filogenias robustas para o grupo sugerindo uma condição de parafilia para o mesmo. Assim estudos adicionais devem ser realizados para caracterização das possíveis espécies novas encontradas e confirmação das relações entre elas, principalmente sua relação com a subfamília Hypoptopomatinae que também se apresentou como parafilética.

ÍNDICE

Introdução_____	7
Objetivo_____	14
Metodologia_____	14
Resultados e Discussão_____	22
Análise populacional do gênero <i>Neoplecostomus</i> _____	22
Análise das relações filogenéticas da subfamília Neoplecostominae_	25
Conclusões_____	30
Referências Bibliográficas_____	30

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos peixes neotropicais tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba *et al.*, 1998), principalmente com a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação dos dados, a metodologia de análise filogenética e o advento de outras metodologias em biologia molecular, valendo-se destacar a técnica do DNA *barcode* aplicada ao estudo da diversidade de peixes. Apesar disso, o padrão de relacionamento filogenético dentre muitos de seus grupos é ainda pouco conhecido diante da enorme variedade de espécies que apresenta, necessitando, portanto, da realização de estudos adicionais.

Entre os Ostariophysi, Siluriforme é a ordem mais diversificada e amplamente distribuída, o que resulta na complexidade taxonômica observada atualmente. O número de Siluriformes neotropicais conhecidos é de 1.648 espécies, divididas em 15 famílias (Reis *et al.*, 2003). Esses números ainda devem ser significativamente incrementados devido à contínua descoberta de novos táxons e aos avanços no conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos. A América do Sul abriga grande parte da diversidade biológica da região Neotropical e possui um sistema de bacias de drenagem amplo e complexo, tanto quanto a fauna que o habita. Dentre as principais bacias hidrográficas que drenam o Escudo Brasileiro destacam-se a Amazônica com cerca de 7.000.000 Km² e entre 1.500 e 5.000 espécies (Santos & Ferreira 1999) e a do Paraná mais o rio Uruguai com 2.985.000 Km² e aproximadamente 600 espécies (Latrubesse *et al.* 2005).

Na região do Alto Paraná com 900.000 km² (Figura 1) são descritas 310 espécies (Langeani, F. 2007) e cerca de 50 estão em processo de descrição. Muitos inventários e trabalhos recentes provam a existência de uma fauna bastante diversificada em ambientes de endemismo, principalmente em riachos e cabeceiras. (e.g., Casatti *et al.* 2001, Castro & Casatti 1997, Castro *et al.* 2003, 2004, 2005, Langeani *et al.* 2005a,b, Langeani, F. 2007). Esses trabalhos de levantamento somados as revisões realizadas em museus e coleções, provam que as informações sobre a composição ictiofaunística do Alto Paraná, e assim, conseqüentemente, de toda região neotropical do Brasil é incompleta,

já que o Alto Paraná é a região mais estudada do país. Observando-se esses dados e trabalhos advém a necessidade de mais estudos para se obter o conhecimento da diversidade brasileira como um todo.

Armbruster (2004), em um amplo trabalho, realizado com base em caracteres de morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestivo da família Loricariidae, com ênfase nas subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, apresentou uma nova hipótese de relacionamento para Loricariidae (Figura 2). Nessa hipótese foi reconhecido, entre outras coisas, o monofiletismo de várias subfamílias e a subfamília Neoplecostominae foi expandida para incluir também as espécies dos gêneros *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina* e algumas espécies de *Hemipsilichthys* (hoje apenas com três representantes do gênero, o restante está sendo transferido para o gênero *Pareiorhaphis*, Reis *et al.*, 2006). Por outro lado a subfamília Neoplecostominae, como definida por Armbruster (2004) é parafilética, ver Figura 2. A mais recente classificação para a família Loricariidae dividiu-a em seis subfamílias, de acordo com Reis *et al.* (2006): Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Hypostominae (ver Figura 3). Ainda de maneira não formal Reis *et al.* (2006) criou uma nova subfamília chamada Delturinae para receber os representantes do gênero *Delturus* e os três representantes de *Hemipsilichthys* restantes *H. gobio* (Lütken, 1874), *H. papillatus* Pereira *et al.*, 2000 e *H. nimius* Pereira *et al.*, 2003. Assim este grupo, depois de Lithogeneinae, torna-se o grupo mais basal dentro de Loricariidae.

Montoya-Burgos *et al.* (1998), utilizando segmentos de genes 12S e 16S do rRNA mitocondrial, elaboraram uma filogenia molecular para cerca de 50 espécies da família Loricariidae, obtendo como resultados seu monofiletismo (Figura 4). Segundo este trabalho *Hemipsilichthys gobio* foi o membro mais basal da família Loricariidae analisado. Assim as relações entre os representantes da família Loricariidae está longe de ser resolvida e até o presente momento nenhuma hipótese concreta sobre as relações entre as espécies desse grupo foi proposta.

No presente momento muitas espécies estão sendo descobertas e algumas já estão processo de descrição, principalmente, referentes ao gênero *Neoplecostomus*, destacando-se entre elas as da Bacia do Alto Rio Paraná (Zawadzki *et al.*, comunicação pessoal). O gênero *Neoplecostomus*, até pouco

tempo, apresentava as espécies classificadas por bacias hidrográficas. Na Bacia do Rio Paraná como um todo havia apenas uma espécie classificada para o gênero, *Neoplecostomus paranensis* (Langeani, 1990). Porém, novos estudos baseados em morfologia externa e biologia molecular estão promovendo a descoberta de um conjunto de novas espécies. Dessa forma pode-se medir a grande quantidade de biodiversidade ainda por ser descoberta, não só na Bacia do Alto Paraná, mais também nas bacias adjacentes referentes principalmente ao gênero *Neoplecostomus*.

Em todo processo de conhecimento da biodiversidade sabe-se hoje que apenas as ferramentas morfológicas não são suficientes para o reconhecimento e posicionamento filogenética do conhecimento a cerca de tal biodiversidade. Somada a esta necessidade encontra-se o advento de novas técnicas em biologia molecular, que vêm em conjunto com a sistemática e taxonomia tradicional tentar, num espaço de tempo mais curto, compreender e caracterizar todo este conhecimento. Dentro da biologia molecular um grande consórcio intitulado “The Barcode of Life”, propõem uma nova técnica para o rápido reconhecimento e a diferenciação de espécies baseada na análise do segmento do Gene Mitocondrial COI (Citocromo Oxidase I). Este gene foi escolhido por ser um gene conservado o suficiente para ser amplificado com uma ampla classe de primers e divergente o suficiente para resolver a diferenciação entre as espécies. Assim, para os animais, segundo (Folmer et al. 1994), o COI tem grande potencial para diferenciar as espécies de animais. Com tudo diferentes genes e protocolos podem ser necessários para diferentes grupos de organismos como plantas, fungos, bactérias, e protistas. Dessa forma o consorcio “The Barcode of Life” consiste numa ferramenta que vem somar-se a outras já existentes, e é de grande importância para o reconhecimento, compreensão e investigação mais aprofundada nas relações evolutivas entre os grupos que compõe a árvore da vida.

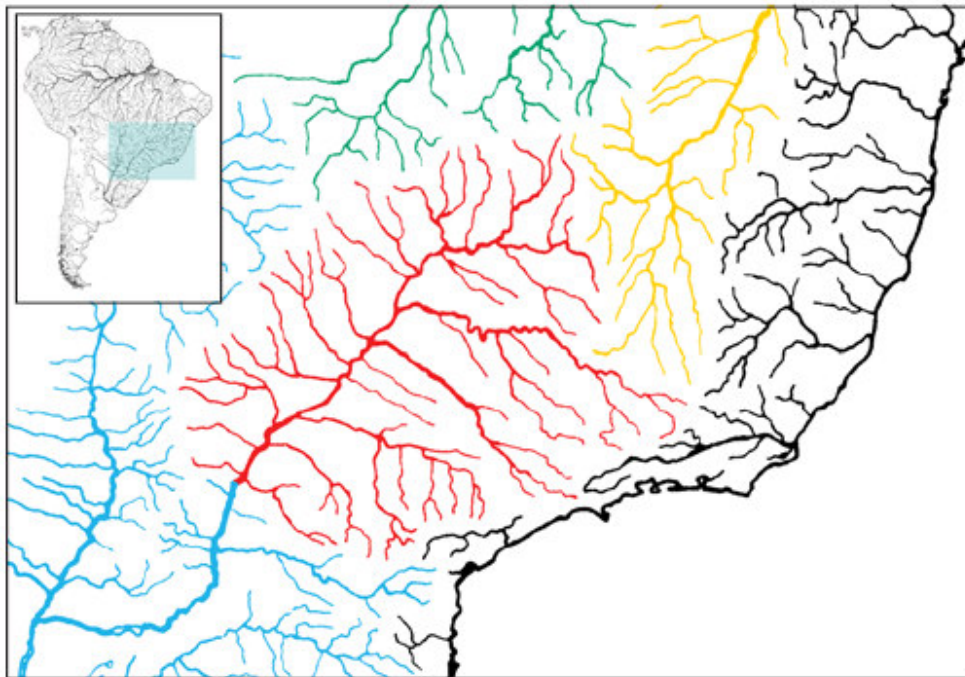


Figura 1. Sistema do Alto rio Paraná (vermelho) e bacias vizinhas do Paraguai e Baixo Paraná (azul), Araguaia/Tocantins (verde), São Francisco (amarelo) e rios costeiros (preto). (Langeani, F. *et al.* 2007)

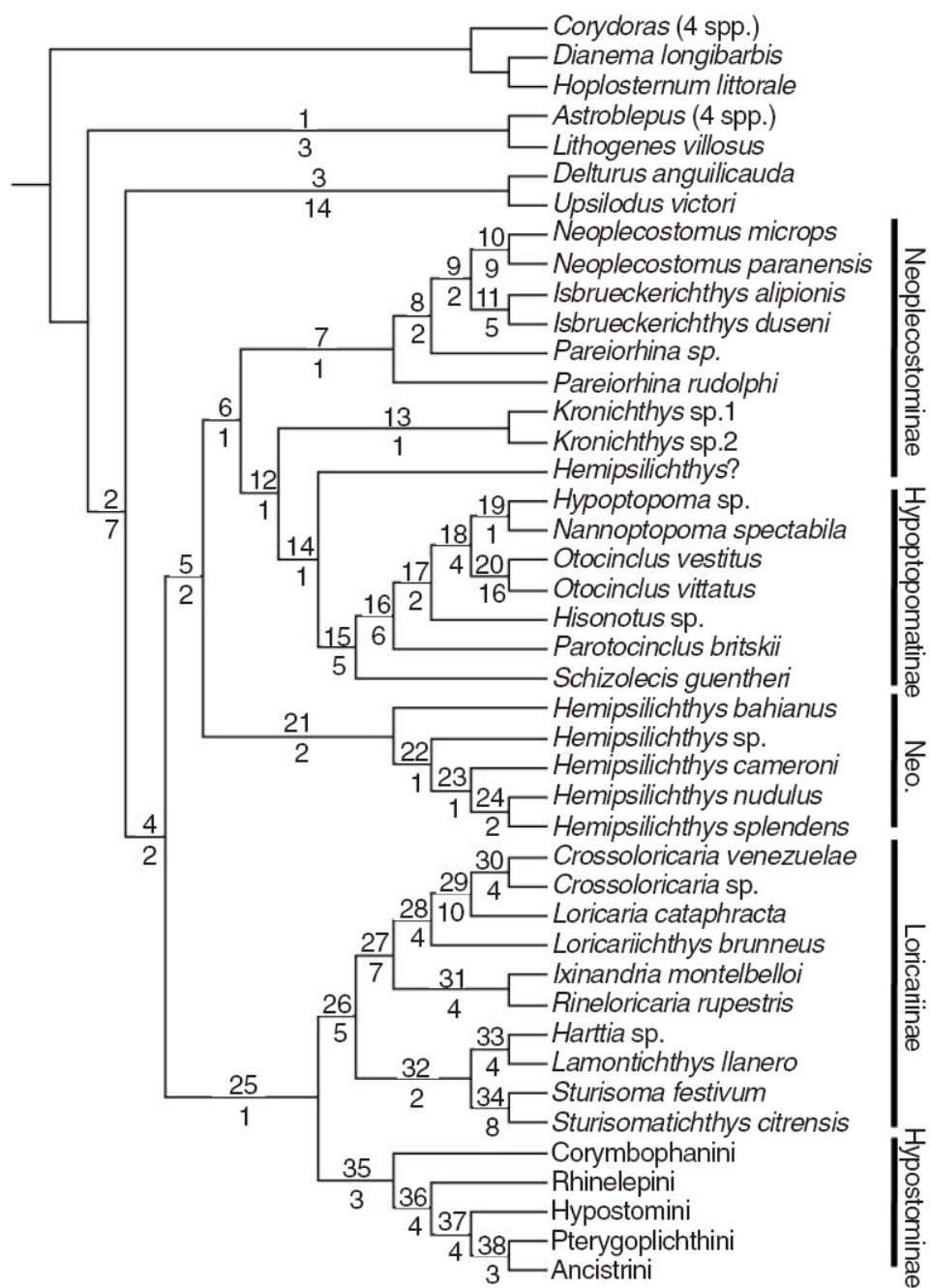


Figura 2. Filogenia da família Loricariidae segundo Armbruster (2004). Números acima dos ramos indicam o número dos cladros discutidos pelo autor e os números abaixo dos ramos representam índices de decaimento.

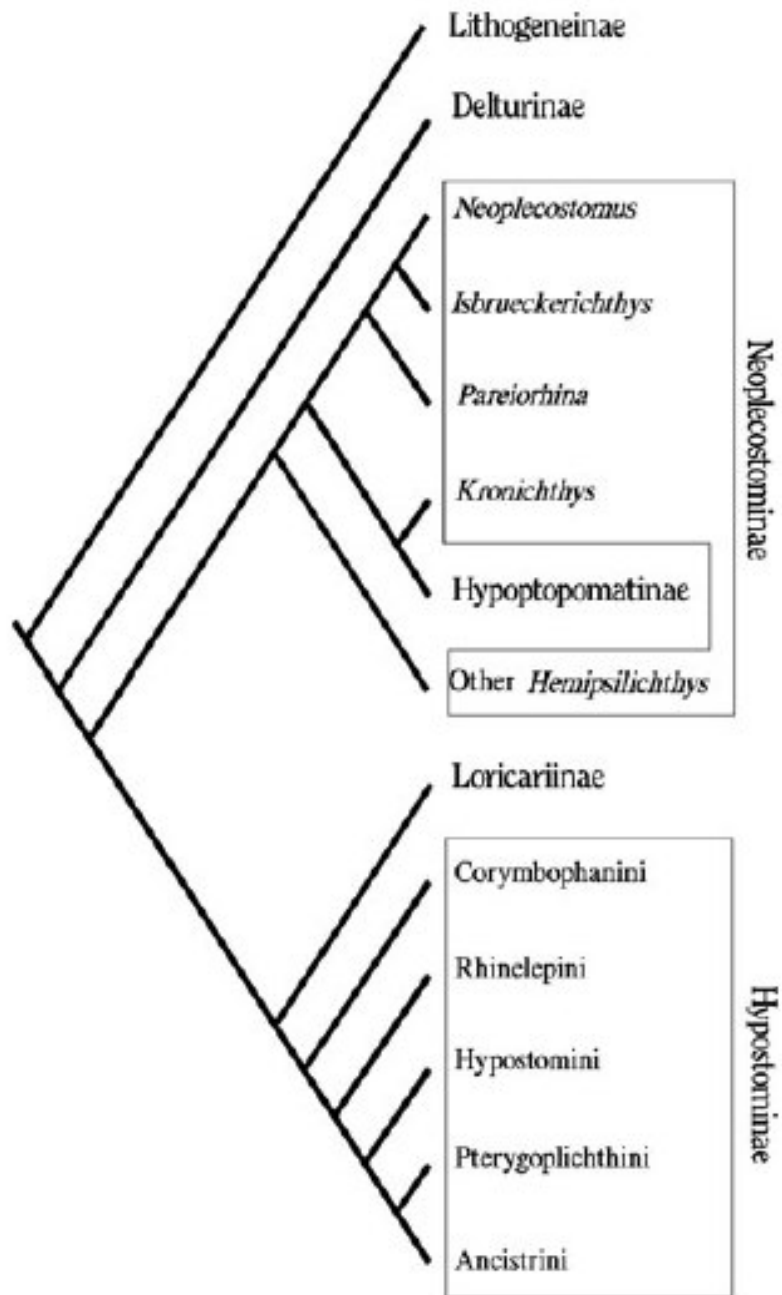


Figura 3. Filogenia Reis (2006) mostrando a relação dos representantes da família Loricariidae, modificado de Armbruster (2004).

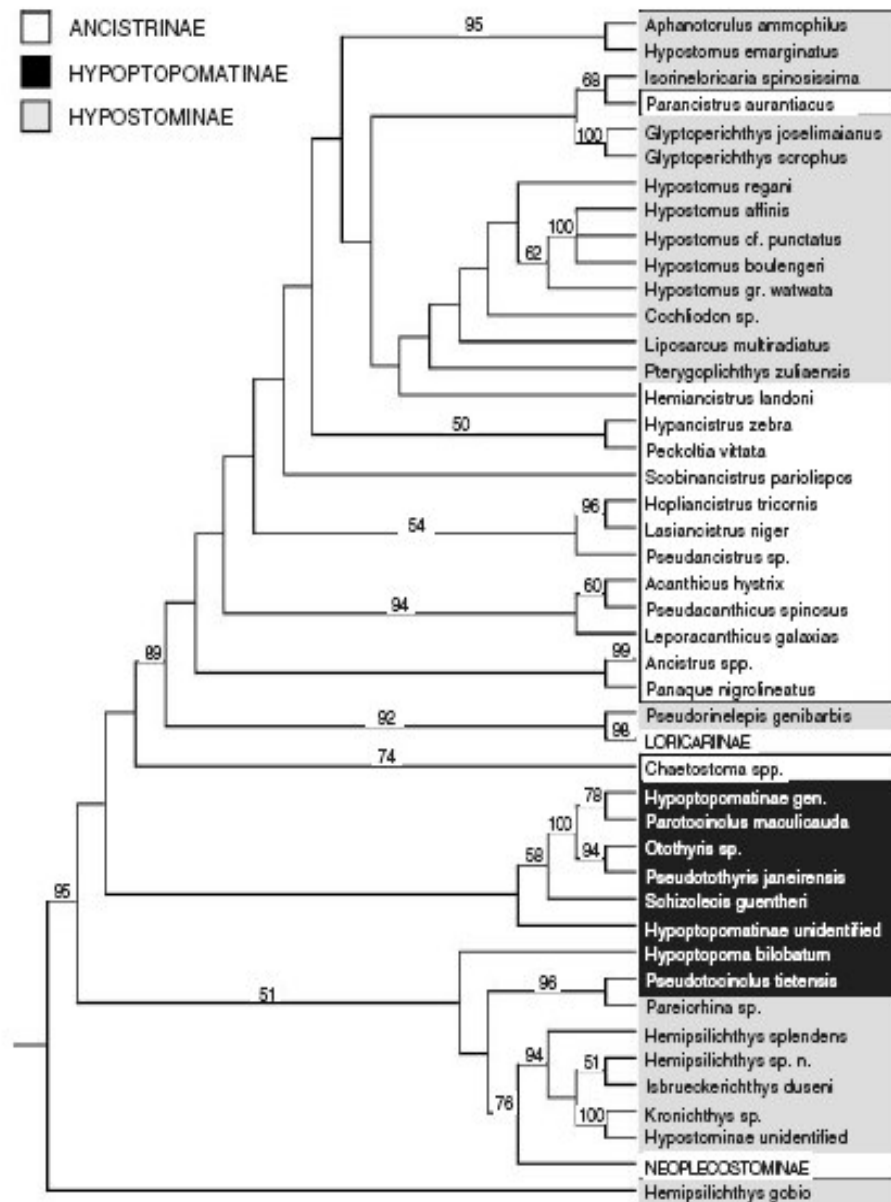


Figura 4. Filogenia proposta por Montoya-Burgos *et al.* (1998), baseada em seqüências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S, para a família Loricariidae. Os números acima dos ramos representam valores de *bootstrap* encontrados nas análises efetuadas.

2. OBJETIVO

Como objetivo principal o presente estudo visa procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento das espécies da subfamília Neoplecostominae. Como objetivos específicos tivemos:

1º Seqüenciar o maior número de segmentos do genoma mitocondrial e nuclear, do maior número de espécies representantes da subfamília Neoplecostominae, com o propósito de construir uma árvore filogenética robusta para o grupo;

2º Realizar uma análise combinada dos dados obtidos no presente estudo com os dados morfológicos disponíveis na literatura para obter uma árvore filogenética consenso;

3º Realizar uma análise dos dados referentes ao fragmento do gene COI para se verificar o valor de divergência genética média entre as espécies de *Neoplecostomus*, para assim, sugerir análise morfológica de exemplares de localidades seqüenciadas numa verificação de possível existência de espécies novas.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS:

Nas análises foram utilizadas amostras depositadas na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. Na **TABELA 1** constam as amostras seqüenciadas, analisadas e em processo de análise populacional do gênero *Neoplecostomus*. Os representantes da subfamília Neoplecostominae utilizados até o presente momento na análise filogenética estão listados na **TABELA 2**. Amostras de *Neoplecostomus franciscoensis*, *Neoplecostomus granosus* e *Neoplecostomus variipictus* deverão ainda ser coletadas para realização das análises moleculares. Para uma comparação com outros grupos

relacionados foram utilizadas amostras das subfamílias Loricariinae (TABELA 3) e Hypoptopomatinae (TABELA 4).

Tabela 1. Amostras utilizadas no estudo populacional do gênero *Neoplecostomus*.

ID	LOTE	REGISTRO	ESPÉCIE	LOCALIDADE	COI	COORDENADAS
01	2732	17438	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
02	2732	17440	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
03	2732	17441	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
04	2732	17445	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
05	2732	17446	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
06	2732	17447	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
07	2732	17448	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
08	2732	17449	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP. Bacia do Rio Grande	OK	S 21°19'37.1" W 47°14'19.6"
09	2861	18612	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Salesópolis/SP. Bacia do Rio Tietê	OK	S 23°31'37.2" W 45°45'43.8"
10	2861	18613	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Salesópolis/SP. Bacia do Rio Tietê	OK	S 23°31'37.2" W 45°45'43.8"
11	2861	18614	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Salesópolis/SP. Bacia do Rio Tietê	OK	S 23°31'37.2" W 45°45'43.8"
12	2861	18615	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Salesópolis/SP. Bacia do Rio Tietê	OK	S 23°31'37.2" W 45°45'43.8"
13	2861	18616	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Salesópolis/SP. Bacia do Rio Tietê	OK	S 23°31'37.2" W 45°45'43.8"
14	3506	21292	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/Córrego do Hortelã/Parapanema		S 22°56'28.9" W 48°35'03.2"
15	709	6056	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/ Córrego do Hortelã/Parapanema		S 22°55' W 48°30'
16	709	6049	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/ Córrego do Hortelã/Parapanema	OK	S 22°55' W 48°30'
17	709	6048	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/ Córrego do Hortelã/Parapanema		S 22°55' W 48°30'
18	709	7576	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/ Córrego do Hortelã/Parapanema	OK	S 22°55' W 48°30'
19	2937	19505	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Botucatu/Véu de Noiva/Parapanema		S 22°59'25.3" W 48°25'37.9"
20	3883	22485	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Avaré/Rio Novo/Parapanema		S 23°01'27.4" W 48°49'41.0"
21	3883	22483	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Avaré/Rio Novo/Parapanema		S 23°01'27.4" W 48°49'41.0"
22	Caixa	9423	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Rio Corumbá/GO	OK	Cidade
23	5034	24680	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Londrina/PR	OK	Cidade
24	5034	24681	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Londrina/PR	OK	Cidade
25	5035	24682	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Polinópolis/PR	OK	Cidade
26	5035	24683	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Polinópolis/PR	OK	Cidade
27	5036	24684	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Ponta Grossa/PR	OK	Cidade
28	5036	24685	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Ponta Grossa/PR	OK	Cidade
29	634	7606	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Pindamonhangaba/SP		S 22°47' W 45°27'
30	Caixa	9701	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Fort (Tibagi)/SP	OK	Cidade
31	Caixa	9700	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Fort (Tibagi)/SP	OK	Cidade
32	Caixa	9699	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Fort (Tibagi)/SP	OK	Cidade
33	645	7593	<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba/SP	OK	S 22°46' W 45°27'
34	645	7582	<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba/SP		S 22°46' W 45°27'
35	646	7835	<i>Neoplecostomus microps</i>	Campos do Jordão/SP/Paraíba do Sul		S 22°51,807' W 45°36,399'
36	Caixa	7561	<i>Neoplecostomus microps</i>	Campos do Jordão/SP/Paraíba do Sul/SP		Cidade
37	Caixa	9174	<i>Neoplecostomus microps</i>	Salesópolis/SP		Cidade
38	Caixa	9175	<i>Neoplecostomus microps</i>	Salesópolis/SP		Cidade
39	1094	10232	<i>Neoplecostomus microps</i>	Santa Bárbara do Tugúrio/MG		S 21°14,796' W 43°34,124'
40	1094	10259	<i>Neoplecostomus microps</i>	Santa Bárbara do Tugúrio/MG		S 21°14,796' W 43°34,124'
41	3406	20406	<i>Neoplecostomus microps</i>	Paraíba do Sul/Rio Macaquinho/SP		S 22°49'51.2" W 44°51'53.8"
42	2120	21357	<i>Neoplecostomus microps</i>	Campos da Cunha/SP/Rio Paraitinga		S 22°52'13.0" W 44°51'02.8"
43	3415	20365	<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio Pombas/MG/Rio Paraíba do Sul		S 21°15'16.2" W 43°11'55.7"
44	2551	15243	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Domingos Martins/ES	OK	S 20°24'30.3" W 40°54'55.5"
45	2551	17104	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Domingos Martins/ES		S 20°24'30.3" W 40°54'55.5"
46	2551	17103	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Domingos Martins/ES		S 20°24'30.3" W 40°54'55.5"
47	1096	10269	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Desterro de Melo/MG/Rio Doce		S 21°08,947' W 43°23,973'
48	1096	10268	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Desterro de Melo/MG/Rio Doce		S 21°08,947' W 43°23,973'
49	Caixa	9735	<i>Neoplecostomus ribeirensis</i>	Rio Iporanga/Iporanga/SP		Cidade
50	1086	10248	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Barbacena/MG/Rio das Mortes		S 21°16,432' W 43°38,613'
51	1086	10228	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Barbacena, MG/ Rio das Mortes		S 21°16,432' W 43°38,613'
52	1086	10244	<i>Neoplecostomus sp.</i>	Barbacena, MG/ Rio das Mortes		S 21°16,432' W 43°38,613'

TABELA 2. Espécies originalmente propostas para análises das relações filogenéticas da subfamília Neoplecostominae mais *Hemipsilichthys gobio* da subfamília Delturinae. Genes mitocondriais, amostras seqüenciadas e em processo de seqüenciamento.

ID	REGISTRO	ESPÉCIE	LOCALIDADE	COI	16S	12S
01	17441	<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Cajuru/SP	OK	OK	
02	18616	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Salesópolis/SP	OK	OK	
03	10248	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Barbacena/SP	OK	OK	
04	24680	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Londrina/PR	OK	OK	
05	24683	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Palinópolis/PR	OK	OK	
06	24685	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Ponta Grossa/PR	OK	OK	
07	9701	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Fort (Tibagi)/PR	OK	OK	
08	7593	<i>Neoplecostomus microps</i>	Pindamonhangaba/SP	OK	OK	
09	15243	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Domingos Martins/ES	OK	OK	
10	10269	<i>Neoplecostomus</i> sp.	Desterro de Melo/MG	OK	OK	
11	7989	<i>Pareiorhaphis steindachneri</i>	Jaraguá do Sul/SC	OK	OK	
12	8935	<i>Pareiorhaphis vestigipinnis</i>	Lajes/SC	OK	OK	OK
13	7363	<i>Pareiorhaphis hystrix</i>	Tainhas/RS	OK	OK	
14	8258	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Guarua/SC	OK	OK	OK
15	6319	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	Rio Betori/SP	OK	OK	
16	6323	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	Iporanga/SP	OK	OK	
17	17400	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Campinhos/PR			
18	9115	<i>Kronichthys</i> sp.	Lapa/PR			
19	12886	<i>Kronichthys</i> sp.	Mongaguá/SP			
20	8304	<i>Kronichthys lacerta</i>	Morretes/PR	OK	OK	
21	15096	<i>Kronichthys heylandi</i>	Parati/RJ	OK	OK	
22	6293	<i>Kronichthys subteres</i>	Vale do Ribeira/SP	OK	OK	
23	6334	<i>Kronichthys subteres</i>	Iporanga/SP			
24	7579	<i>Pareiorhina</i> sp.	Pindamonhangaba/SP	OK	OK	
25	24189	<i>Pareiorhina</i> sp.	Jundiá/SP	OK	OK	
26	24208	<i>Pareiorhina</i> sp.	Jundiá/SP	OK	OK	
27	15363	<i>Hemipsilichthys gobio</i>	Bairro dos Macacos/SP	OK	OK	

TABELA 3. Amostras da subfamília Loricariinae utilizadas.

ID	Registro	Espécies	Localidade de coleta	COI	16S
02	4060	<i>Pseudohemiodon</i> sp.	Rio Branco/AC	OK	OK
03	8305	<i>Rineloricaria kronei</i>	Jaraguá do Sul/SC	OK	OK
04	11505	<i>Rineloricaria lanceolata</i>	Barra do Garça/MT	OK	OK
06	6333	<i>Rineloricaria</i> sp.	Iporanga/SP	OK	OK
07	11818	<i>Rineloricaria</i> sp.	Goiás/GO	OK	OK
08	4045	<i>Sturisoma</i> sp.	Rio Branco/AC	OK	OK

TABELA 4. Amostras da subfamília Hypoptopomatinae utilizadas.

ID	Registro	Espécies	Localidade de coleta	COI	16S
01	8464	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Morretes/PR	OK	OK
03	6135	<i>Hisonotus insperatus</i>	Botucatu/SP	OK	OK
04	7961	<i>Corumbataia cuestae</i>	Botucatu/SP	OK	OK
05	11827	<i>Corumbataia tocantinensis</i>	Goiás/GO	OK	OK
06	11171	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Miracatu/SP	OK	OK
07	13680	<i>Otothyris travassossi</i>	Canavieiras/BA	OK	OK
08	13851	<i>Otothyris juquiaie</i>	Guaratuba/PR	OK	OK
09	8421	<i>Pseudotothyris obtusa</i>	Praia do Leste/PR	OK	OK
10	13902	<i>Pseudotothyris obtusa</i>	Joinvile/SC	OK	OK
11	7564	<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	Juquitiba/SP	OK	OK
12	13846	<i>Schizolecis guntheri</i>	Morretes/PR	OK	OK

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA Genômico (Tampão de Extração)

Esse procedimento foi realizado de acordo com a técnica descrita por ALJANABI & MARTINEZ (1997).

- 1- Colocar em um tubo de 1,5 mL, 290ul de tampão de extração (30mM Tris-HCL, 10mM EDTA, 1% SDS), 10ul de Proteinase K (10mg/mL) e um pedaço de tecido (cerca de 10,5 mg). Retirar totalmente o álcool do tecido (com papel absorvente) antes de iniciar a extração de DNA;
- 2- Deixar em banho-maria à 55°C por 2 a 3 horas;
- 3- Acrescentar 100ul de solução de NaCl 5M e misturar bem, invertendo o tubo vagarosamente;
- 4- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 5- Remover 300uL de sobrenatural e transferir para um novo tubo de 1,5mL;
- 6- Adicionar 600uL de etanol 100% gelado (mantido no congelador);
- 7- Deixar no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos;
- 8- Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C;
- 9- Descartar o etanol;
- 10- Adicionar 1000uL de etanol 70%;
- 11- Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C;
- 12- Descartar o etanol;
- 13- Secar em estufa a 37°C por 20 a 30 minutos;
- 14- Adicionar 200uL de água ultrapura autoclavada;
- 15- Deixar hidratando a temperatura ambiente por 24 horas;
- 16- Aliquotar 150uL para guardar no freezer -20°C (solução estoque) e o restante manter na geladeira 4°C (solução de uso).

3.2.2 Amplificação dos Segmentos de DNA (PCR)

A amplificação foi efetuada num ciclador térmico (PCR) utilizando-se um volume total de 25µl, contendo 14,95µl de água destilada; 1,45µl de dNTP (8mM); 2,5 µl de tampão 10X; 1,0 µl de cada primer (10µM); 2.0µl de MgCl e 0,1 µl de DNA Polymerase (1 unidade). Cada reação foi feita com 2µl de DNA . Cada ciclo de PCR foi composto, basicamente, da desnaturação por 1 minuto a 94°C, hibridação por 1 minuto a 50-65°C e extensão por 2 minutos a 72°C.

Esse ciclo foi repetido 35 vezes e o passo final incluiu uma extensão final por 5 minutos a 72°C.

Os genes mitocondriais que foram seqüenciados são: 16s rRNA, com os primers: 16Sar: 5'-ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT 3' e 16Sbr: 5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3', que amplificam um segmento de cerca de 550 pares de bases (Kocher et al., 1989) e uma parte do gene Citocromo Oxidase I, com os primers: FishF1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3' e FishR1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3', que amplificam um segmento de cerca de 630 pares de bases (Ward et al., 2005). Foram feitos diversos ensaios para amplificação do gene 12S rRNA (cerca de 950 pares de bases) (L941-PHE 5'- AAA TCA AAG CAT AAC ACT GAA GAT G -3' e H2010-VAL 5'- CCA ATT TGC ATG GAT GTC TTC TCG G -3'), porém não foram obtidos resultados significativos até o momento.

3.2.3 Limpeza com Resina PEG

A purificação do DNA foi realizada seguindo o protocolo utilizado por Travis Glenn, disponível no endereço http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/protocols.htm (http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf).

- 1- Adicionar 25µl de PEG 205- NaCl 2,5M ao produto de PCR amplificado;
- 2- Misturar com a pipeta várias vezes;
- 3- Incubar a 37°C em estufa ou termociclador por 15 minutos;
- 4- Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (25°C)
- 5- Sugar o sobrenadante;
- 6- Adicionar 63µl de álcool 80% gelado;
- 7- Esperar 2 minutos;
- 8- Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente (25°C);
- 9- Sugar o sobrenadante;
- 10- Adicionar 63µl de álcool 80% gelado;
- 11- Esperar 2 minutos;
- 12- Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente (25°C);
- 13- Sugar o sobrenadante;
- 14- Secar em estufa (37°C) por cerca de 10 minutos;
- 15- Eluir em TE adicionando 12,5µl esperar por 30 minutos;
- 16- Correr 1µl no gel para averiguar a limpeza.

3.2.4 Reação de PCR para Seqüenciamento

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit DyeTerminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). O procedimento utilizado foi o seguinte:

- 1- Prepara-se uma amostra e duas réplicas para cada e para isso, prepara-se uma solução MIX, para cada uma das amostras, contendo:

SOLUÇÕES	VOLUME
DNA (Amplificado e limpo com a Resina PEG	1,0 µl
Primer (Diluído na proporção 3:1)	2,0 µl
Solução Pré-Mix (Nucleotídeos marcados com fluorescência)	2,0 µl
H ₂ O Autoclavada	4,0 µl
Volume Final	9,0 µl

- 2- Leva-se os *ependorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

PASSO	PROCESSO	TEMPERATURA	TEMPO
1	Desnaturação Inicial	94°C	3'
2	Desnaturação	94°C	30''
3	Anelamento	56°C	1'
4	Extensão	68°C	2'
5	Volta para o passo 2	-	35 X
6	Extensão Final	68°C	4'

Após feito o PCR de seqüenciamento foi feita a limpeza desse PCR seguindo os passos que vem a seguir.

3.2.5 Limpeza do PCR de Seqüenciamento:

Em um local com ausência parcial de iluminação:

- 1- Adiciona-se em cada tubo: 2,0 µl de Acetato de Sódio (1,5M) + EDTA 250mM e 80 µl de Etanol 95% Gelado.
- 2- Centrifuga-se por 20':15" a 16000 rpm à 20°C;
- 3- Com cuidado, suga-se o líquido do lado oposto a dobradiça do tubo;
- 4- Adiciona-se 250 uL de Etanol 70% gelado;
- 5- Centrifuga-se por 10':15" a 16 rpm à 4°C;
- 6- Com cuidado, suga-se o Etanol e deixar o tubo secando em estufa à 37°C por aproximadamente 1 hora ou até não restar mais álcool no interior do tubo;

- 7- Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4° C envolto em papel alumínio, até o momento do seqüenciamento, quando então deve-se:
- 8- Ressuspender as amostras com 4 uL de formamida + Blue Dextran em cada.

3.2.6 Seqüenciamento de DNA

As seqüências parciais dos genes mitocondrial 16S rRNA e COX 1 (fish) foram determinadas o seguinte procedimento:

1. Lava-se as placas com Extran (detergente).
2. Aquece-se 2 L de Água Milli Q por cerca de 8 minutos.
3. Lava-se as placas com a água aquecida, sem Extran, e deixa-se secar bem.
4. Adiciona-se 18g UREA, 25ml de Água Milli Q, 5ml de TBE 10X e 5ml de Long Ranger.
5. Monta-se as placas no cassete (previamente limpo e seco).
6. Adiciona-se rapidamente ao recipiente, contendo a UREA filtrada, 250 µl do Persulfato de Amônia diluído em água e 35 µl de TMED.
7. Aplica-se o gel e coloca-se o pente virado ao lado contrário na parte superior da placa.
8. Espera-se até que o gel se polimerize por cerca de 2 horas e então:
9. Lava-se a placa com água filtrada e aquecida a fim de se retirar o excesso de gel que possa permanecer do lado de fora da placa, principalmente próximo a região de leitura do laser.
10. No computador, clica-se no ícone *Plate check* para verificar se a placa esta limpa.
11. Coloca-se o TBE seq 1X nas cubas inferior e superior até as marcas limites.
12. Posteriormente realizando-se a Pré-corrída:
13. Durante a pré-corrída, ressuspende-se as amostras em 4 µl de Formamida + Blue Dextran.
14. Desnatura-se as amostras no termociclador à 95° C por 5 minutos.
15. Aplica-se 0,8 µl de cada amostra.
16. Inicia a corrida:
17. Para seqüências de DNA com número de pares de bases acima de 600 o tempo de corrida é de 7 horas.
18. Terminada a corrida, abre-se a imagem do gel e realiza-se o Traquiamento e extração das seqüências.

3.2.7 Obtenção das seqüências consenso

Após o seqüenciamento das amostras e suas réplicas, as seqüências obtidas foram abertas no programa BioEdit, desenvolvido por HALL (1999) e por comparação foi estabelecida uma seqüência consenso do gene para cada indivíduo. Tais seqüências foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato somente texto (extensão .txt).

3.2.8 Alinhamento das seqüências, Análise Filogenética e Análise Populacional.

As seqüências parciais do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I foram alinhadas com o auxílio dos programas BIOEDIT (*Sequence Alignment Editor*) versão 5.0.9 (HALL, 1999) e DAMBE (*Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*) versão 4.1.27 (XIA e XIE, 2001).

A visualização gráfica do nível de saturação das substituições foi feita através da plotagem do número de transições e transversões contra a divergência genética estimada pelo modelo TrN+G escolhido pelo Modeltest 3.6 utilizando o programa DAMBE (XIA e XIE, 2001).

Análises filogenéticas baseadas em máxima parcimônia (MP) e Neighbor-Joining (NJ) foram realizadas com o programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004) com buscas heurísticas usando-se a adição aleatória de seqüências e o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR).

Foi testado o grau de confiabilidade das árvores filogenéticas obtidas nas diferentes análises através da reamostragem por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004).

As análises populacionais também foram realizadas no programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004) com criação de grupos para os representantes de mesma localidades e a comparação e verificação da media da distância genética entre os representantes dos grupos para verificação do valor da distância entre as amostras de mesma localidade e posterior comparação com a média de cada grupo. Esses valores uma vez determinados puderam ser

usados para se inferir na possível indicação de espécies novas. Num consenso geral entre 0,5% e 2% de divergência genética os representantes dos grupos puderam ser considerados mesmas espécies e acima de 2% como indício de espécie nova.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise populacional do gênero *Neoplecostomus*

Na análise populacional foram obtidas seqüências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I para 26 amostras do gênero *Neoplecostomus*. Essas amostras foram alinhadas através do programa DAMBE (*Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*) versão 4.1.27 (XIA e XIE, 2001) depois foram determinadas as distância genética e desvio padrão no programa MEGA versão 4.0 (Kumar et al., 2004). Nesse programa foram criados grupos para as amostras de mesma localidade, depois calculada média da distância genética mais os desvios padrões entre os representantes do mesmo grupo e entre os diferentes grupos. Quando considerado a distância genética dentro dos grupos ela manteve-se em valores baixos, de 0 a 0.8%, esperados para indivíduos da mesma espécie. Nos lugares da tabela onde não aparecem valores há apenas uma única seqüência, representando uma única amostra até o presente momento seqüenciado. Quando comparamos a relação entre os grupos podemos verificar valores de divergência mais altos podendo-se sugerir possíveis espécies novas principalmente quando comparados com algumas já em processo de descrição. O grupo três (**TABELA 1**) representa os *Neoplecostomus* de Cajuru, localidade da espécie tipo descrita. Essa, então, serve como base para comparação com as amostras de outras localidades, e assim, pode-se investigar possíveis espécies novas da bacia do alto Paraná. Foram comparadas com as espécies de *Neoplecostomus paranensis* depositadas no museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, Botucatu, os *Neoplecostomus espiritosantensis*, *N. ribeirenses* e *N. microps* e dessa forma determinou-se o valor de divergência genética entre as espécies já descritas. Esses então quando comparados com a espécie tipo

apresentaram uma divergência genética de 6%, 3% e 8% respectivamente. Adotou-se então 2% como limite de divergência entre espécies novas tendo-se como base a teoria do barcode. A variação mais elevada entre esses grupos, de 3% à 8%, ocorre principalmente devido a dois fatores. O primeiro seria a quantidade de amostras analisadas para o grupo de *N. espiritosantensis* e *N. ribeirensis* que foi de apenas um exemplar. Também deles participarem independentemente, cada um de uma bacia hidrográfica e terem evoluções diferentes e taxas de divergência genéticas diferentes. Assim, comparando-se os valores de divergência dentro das espécies de *Neoplecostomus* já descritas, podemos agora inferir sobre possíveis espécies novas dentro da bacia do alto Paraná, que apesar de ser uma das regiões mais bem estudadas do Brasil, ainda apresenta uma grande quantidade de espécies para serem descritas, principalmente referentes aos *Neoplecostomus*, gênero que ocorre em regiões de corredeira e em locais muito encachoeirados. Foram incluídas nesta tabela principalmente espécies que o professor Claudio H. Zawadzki (comunicação pessoal) sugeriu possíveis de serem diferentes e ainda pouco estudadas. Outras incluídas na análise estão em processo de descrição como é o caso do "*Neoplecostomus yapo*" (Claudio Zawadzki), grupo quatro, que tem uma divergência genética de 3,1% quando comparado com a espécie tipo de *Neoplecostomus paranensis* de Cajuru. Assim, a análise molecular além de sugerir espécies novas independentemente, pode servir como uma ferramenta que venha sustentar hipóteses de espécies já descritas e em processos, principalmente, referentes a espécies crípticas. O *Neoplecostomus* sp1 de Corumbá (GO) apresentou uma divergência de 4,7% sugerindo uma possível espécie nova que deve ser agora analisada mais detalhadamente do ponto de vista morfológico. A mesma situação ocorre com *N. sp.3/Botucatu* (SP), *N. sp4/Londrina* (PR), *N. sp4/Polinópolis* (PR), *N. sp.5/Ponta Grossa* (PR), *N. sp6/Salesópolis* (SP) e *N. sp7/Desterro do Melo* (SP), respectivamente com 2,8%, 2,8%, 2,8%, 2,6%, 2,5%, 12% de divergência genética. Porém pode-se observar que se comparando os exemplares seqüenciados de Londrina e Polinópolis *N. sp4* a divergência é de 0%. Esse valor representa que possivelmente são a mesma espécie os exemplares das duas localidades. Agora o valor de divergência está muito baixo, 0%, devido ao tamanho do fragmento de comparação do COI que é de 480 pb e do número de exemplares

seqüenciados que é pequeno. Inversamente a esse valor baixo temos o exemplar de Desterro do Melo (SP) *N. sp7* que apresentou uma divergência muito alta quando comparamos com a espécie tipo de *Neoplecostomus paranensis* Cajuru (SP), de 12%.

Tabela 5: Grupos contendo amostras de mesma localidade. 1- *Neoplecostomus sp.1*/Corumbá (GO), 2- *N. ribeirensis*/Iporanga (SP), 3- *N. paranensis*/Cajuru (SP) espécie tipo, 4- *N. sp.2*/Tibaji (PR), 5- *N. espiritosantensis*/Domingo Martins (ES), 6- *N. sp.3*/Botucatu (SP), 7- *N. microps*/Pindamonhangaba (SP), 8- *N. sp.4*/Londrina (PR), 9- *N. sp.4*/Polinópolis (PR), 10- *N. sp.5*/Ponta Grossa (PR), 11- *N. sp.6*/Salesópolis (SP), 12- *N. sp.7*/Desterro do Melo (SP).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	n/c											
2	0.054± 0.011	n/c										
3	0.047± 0.010	0.030± 0.008	0.004									
4	0.060± 0.011	0.047± 0.010	0.031± 0.007	0.004								
5	0.079± 0.013	0.079± 0.013	0.061± 0.011	0.074± 0.013	n/c							
6	0.041± 0.009	0.030± 0.008	0.028± 0.008	0.040± 0.009	0.070± 0.012	0.000						
7	0.096± 0.014	0.096± 0.015	0.082± 0.013	0.095± 0.015	0.047± 0.010	0.084± 0.013	0.004					
8	0.059± 0.011	0.045± 0.010	0.028± 0.007	0.003± 0.002	0.073± 0.013	0.039± 0.009	0.094± 0.015	0.000				
9	0.059± 0.011	0.045± 0.010	0.028± 0.007	0.003± 0.002	0.073± 0.013	0.039± 0.009	0.094± 0.015	0.000± 0.000	n/c			
10	0.039± 0.009	0.030± 0.008	0.026± 0.007	0.038± 0.009	0.068± 0.012	0.002± 0.002	0.082± 0.013	0.036± 0.009	0.036± 0.009	n/c		
11	0.051± 0.010	0.029± 0.007	0.025± 0.006	0.045± 0.009	0.074± 0.012	0.034± 0.008	0.090± 0.014	0.043± 0.009	0.043± 0.009	0.031± 0.007	0.008	
12	0.150± 0.019	0.139± 0.018	0.120± 0.016	0.137± 0.017	0.100± 0.015	0.135± 0.018	0.072± 0.013	0.135± 0.017	0.135± 0.017	0.132± 0.018	0.119± 0.016	n/c

4.2 Análise das relações filogenéticas da subfamília Neoplecostominae.

Foram analisados dois genes mitocondriais (citocromo oxidase I e 16S) de 42 amostras (23 de Neoplecostominae, 12 de Hypoptopomatinae e sete de Loricariinae). O nível de saturação das substituições (transições e transversões) em função da distância genética mais adequada ao conjunto de dados (Tamura Nei), obtida através do programa WinModeltest 4.b (David Posada 1998-2000), foi satisfatório para o prosseguimento das análises. Adicionalmente, os valores de R^2 para ambos os genes foram elevados, indicando ausência de saturação dos dados (FIGURA 5).

O conjunto de dados obtidos foi inserido numa matriz final de 1030 caracteres (incluindo-se os *gaps*) e três métodos estatísticos diferentes foram utilizados: Distância Genética (Neighbour-Joining, FIGURA 6), Máxima Parcimônia (FIGURA 7) e Análise Probabilística (MrBayes, FIGURA 8) para se verificar se os resultados seriam congruentes e dariam sustentabilidade nas relações obtidas para esse grupo de peixes. No caso de verificação de incongruências seriam necessários um maior número de caracteres e táxons para a análise.

Os três métodos estatísticos não apresentaram diferenças significativas entre eles, mostrando que o conjunto de dados está consistente para a análise deste grupo. As diferenças observadas ocorreram devido ao estudo com poucos caracteres e táxons para os exemplares que apresentaram diferenças, necessitando, assim, esses, de análises mais aprofundadas. O gênero *Neoplecostomus* como verificado em estudos e trabalhos anteriores manteve-se monofilético com altos níveis de *bootstrap*. Já a espécie *Neoplecostomus paranensis* Cajuru/SP aparece como grupo irmão dos exemplares de Tibaji, Londrina e Polinópolis na análise de distância, ao contrário das análises de Parcimônia e Probabilística, onde essa espécie apresenta-se como grupo irmão das localidades de Barbacena, Salesópolis e Ponta Grossa. O segundo agrupamento então se apresentou consistente, sugerindo que *N. paranensis* Cajuru/SP é mais aparentado desse grupo, mesmo com o *bootstrap* baixo

quando verificado o método de Máxima Parcimônia. Porém de maneira a se verificar este agrupamento de maneira mais sustentada são necessárias análises mais aprofundadas.

A espécie “*Neoplecostomus yapo*” Tibaji/PR apresenta-se em processo de descrição pelo Dr. Claudio H. Zawadzki e mantém-se junto com os *N. sp4.* de Londrina e Polinópolis em todas as análises realizadas com uma distância genética baixa sugerindo-se assim que pode ser a mesma espécie. *N. sp7* de Desterro do Melo aparece mais aparentado ao grupo formado por *N. microps* e *N. espiritosantensis*, apresentado assim com grandes possibilidades de ser uma espécie nova. Com relação aos outros representantes da subfamília Neoplecostominae o gênero *Isbrueckerichthys* aparece grupo irmão das espécies de *Pareiorhaphis* e *Kronichthys*. As espécies de *Pareiorhina* ficam agrupadas com *Pseudotocinclus tietensis* Juquitiba/SP, resultado já verificado em trabalhos anteriores. As outras espécies de Hypoptopomatinae e Loricariinae foram incluídas como grupos externos destacando-se *Hemipsilichthys gobio* Bairro dos Macacos/SP da subfamília Delturinae criada por Reis (2006).

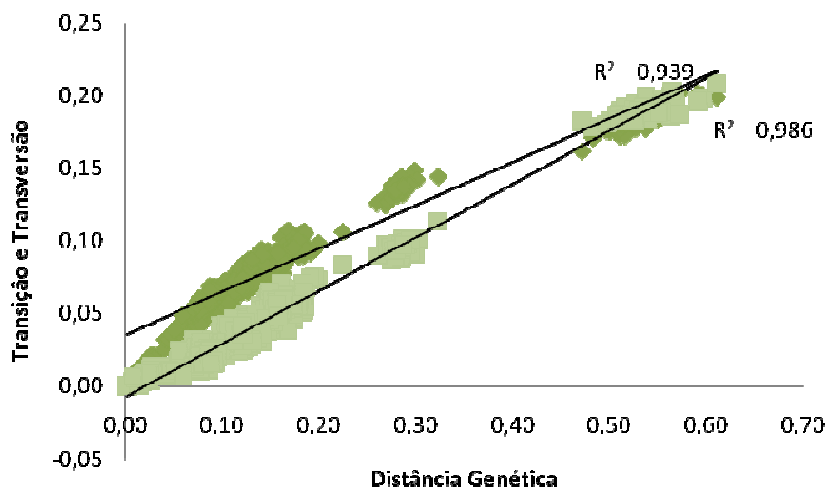


FIGURA 5. Gráfico de avaliação de saturação segundo o modelo Tamura-Nei (93).

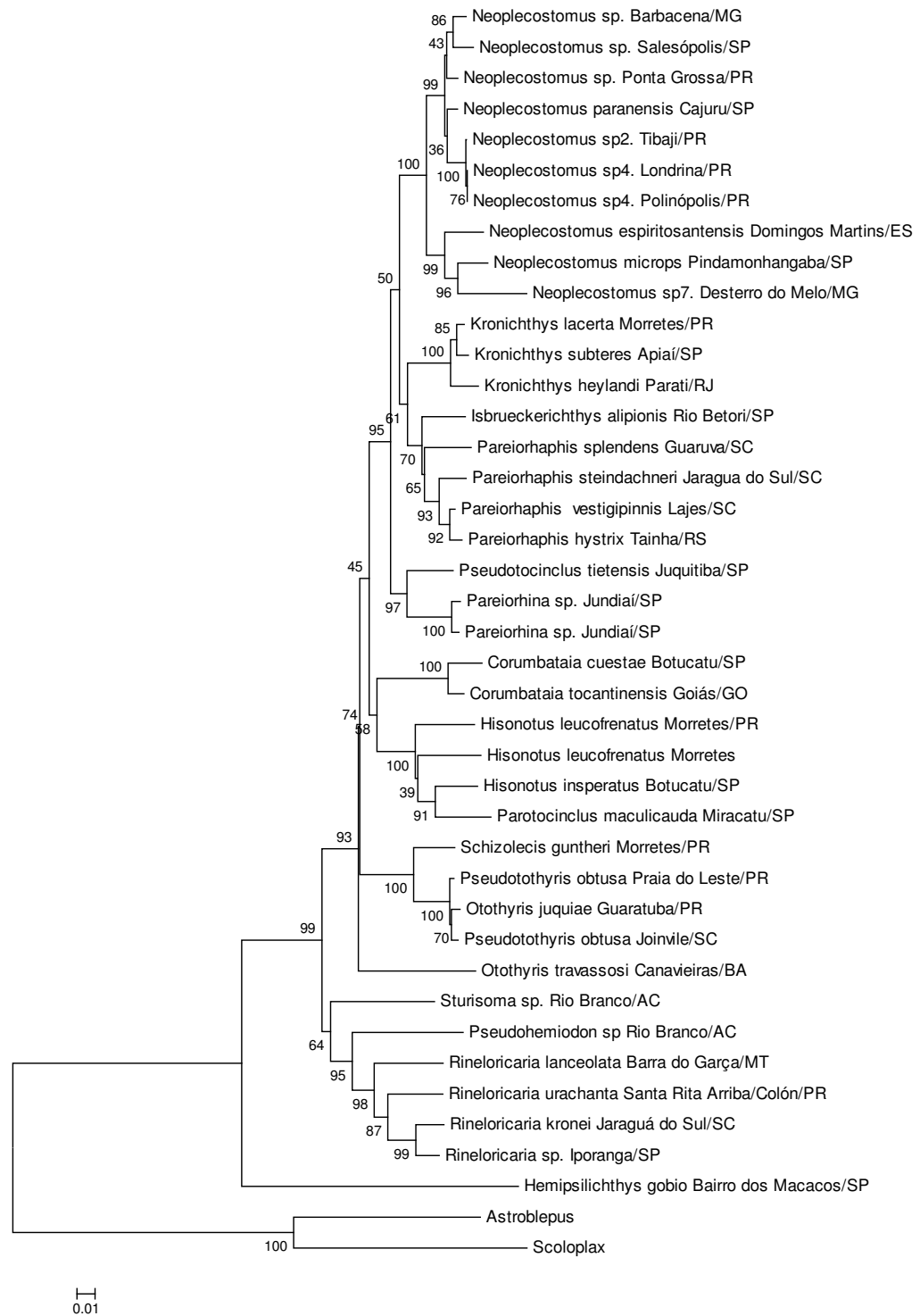


Figura 6. Filogenia obtida após análise pelo método de Neighbour-Joining. Os números em cada nó indicam o valor de *bootstrap* encontrado.

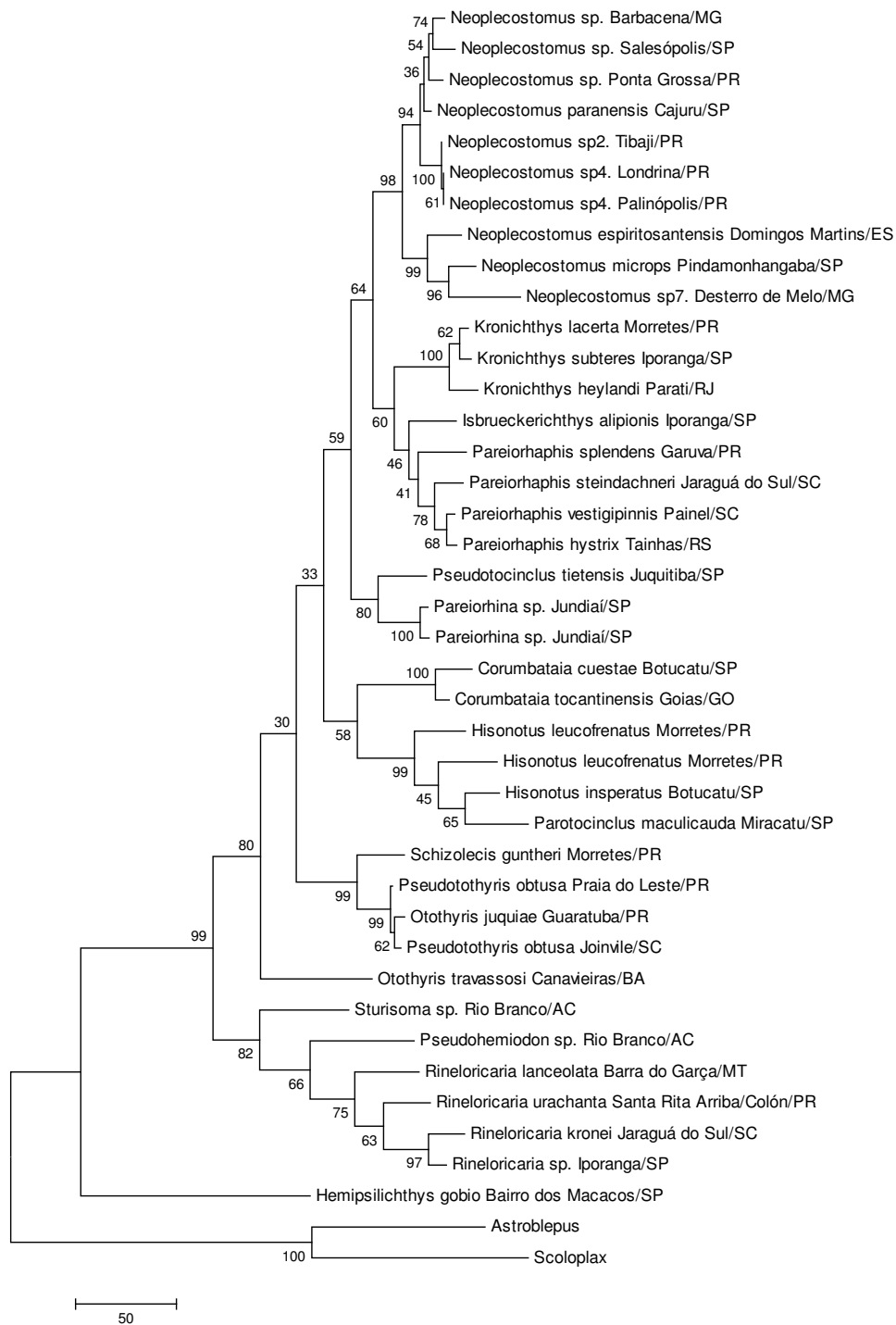


Figura 7. Cladograma de consenso obtido pelas análises de Máxima Parcimônia. Os números em cada nó indicam o valor de *bootstrap* encontrado.

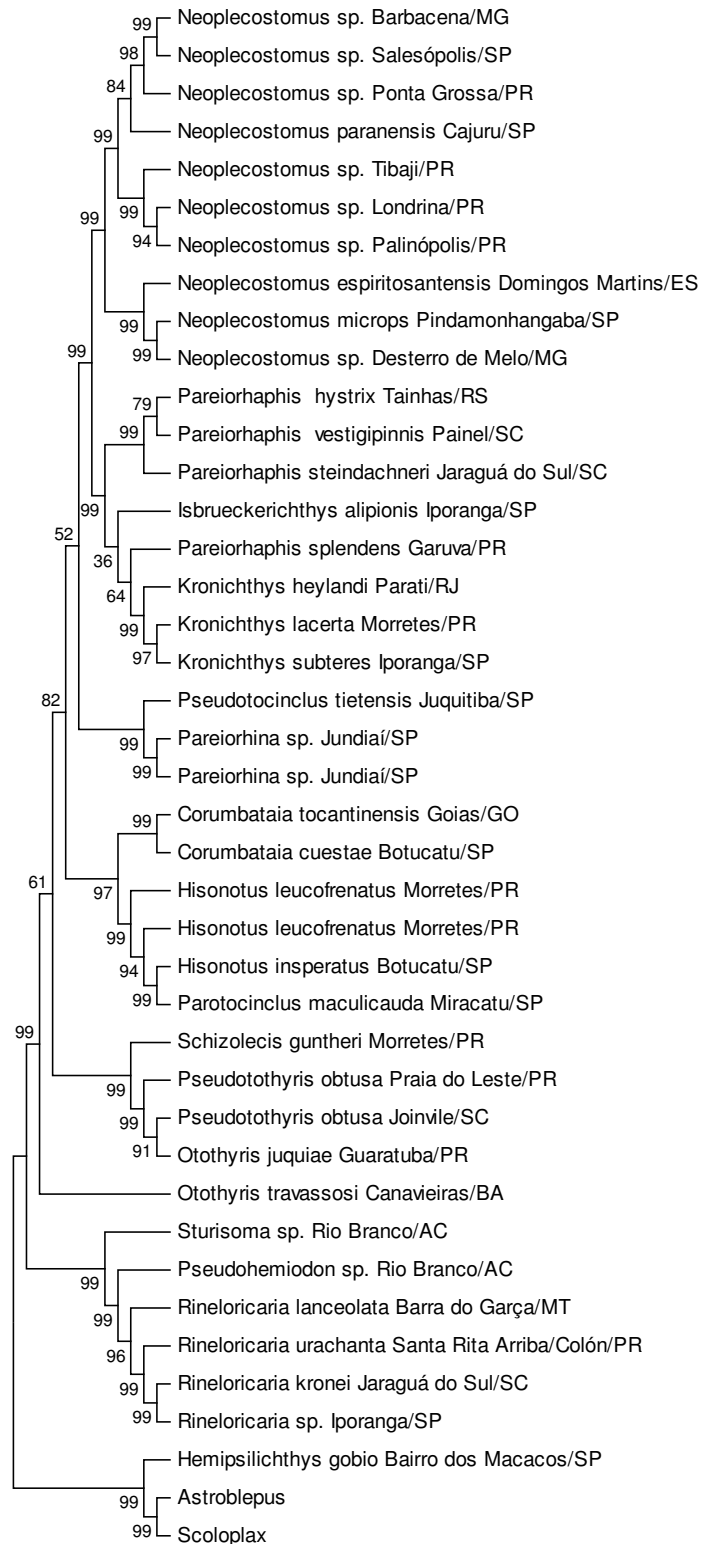


Figura 8. Cladograma de consenso obtido pelas análises probabilísticas através do programa MrBayes.

Em seu trabalho, Armbruster (2004) representa mais detalhadamente os conflitos existentes entre Hypoptopomatinae e Neoplecostominae, sendo que, sempre que corroboramos o status de subfamília de uma, automaticamente negaríamos o mesmo nível taxonômico da outra. Nossos resultados, encontrados até o momento, corroboram a presença de tais conflitos nesse nível taxonômico e trazem uma análise molecular detalhada das relações dentro da subfamília Neoplecostominae e também dentro do gênero *Neoplecostomus*, que em todas as análises apresenta-se sempre monofilético.

5. CONCLUSÕES

- ✓ As análises populacionais sugerem ou corroboram a existência de novas espécies reforçando a necessidade de uma análise morfológica mais detalhada do grupo.
- ✓ Todas as análises realizadas com representantes do gênero *Neoplecostomus* corroboram a hipótese de que esse grupo é monofilético.
- ✓ As análises sugerem que Neoplecostominae e Hypoptopomatinae não são grupos monofiléticos, considerando sua atual composição, e estudos futuros deverão ser realizados para uma melhor caracterização desses grupos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, Vol. 5, 22: 4692-4693.
- Armbruster, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, 1-80.
- Casatti, L., Langeani, F. & Castro, R.M.C. 2001. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná. *Biota Neotrop.* 1(1,2):

- <http://www.biotaneotropica.org.br/v1n12/pt/abstract?article+BN00201122001>.
- Castro, R.M.C. & Casatti, L. 1997. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River basin. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 7(4):337-352.
- Castro, R.M.C., Casatti, L., Santos, H.F., Ferreira, K.M., Ribeiro, A.C., Benine, R.C., Dardis, G.Z.P., Melo, A.L.A., Abreu, T.X., Bockmann, F.A., Carvalho, M., Gibran, F.Z. & Lima, F.C.T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotrop.* 3(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01703012003>
- Castro, R.M.C., Casatti, L., Santos, H.F., Melo, A.L.A., Martins, L.S.F., Ferreira, K.M., Gibran, F.Z., Benine, R.C., Carvalho, M., Ribeiro, A.C., Abreu, T.X., Bockmann, F.A., Dardis, G.Z.P., Stopiglia, R. & Langeani, F. 2004. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* 4(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v4n1/pt/abstract?article+BN0170402004>
- Castro, R.M.C., Casatti, L., Santos, H.F., Vari, R.P., Melo, A.L.A., Martins, L.S.F., Abreu, T.X., Benine, R.C., Gibran, F.Z., Ribeiro, A.C., Bockmann, F.A., Carvalho, M., Pelicão, G.Z., Ferreira, K.M., Stopiglia, R. & Akama, A. 2005. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 16(3):193-214.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sump. Ser.*, 41: 95-98.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca F.X., Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 86: 6196-6200.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001). MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. *Bioinformatics* (submitted).
- Langeani, F., Casatti, L., Gameiro, H.S., Bellucco-Do-Carmo, A. & Rossa-Feres, D.C. 2005a. Riffle and pool fish communities in a large stream of southeastern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 3(2):305-311.

- Langeani, F., Castro, R.M.C., Oyakawa, O.T., Shibatta, O.A., Pavanelli, C.S. & Casatti, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotrop.* Sep/Dez 2007 vol. 7, no. 3 <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03407032007>. ISSN 1676-0603.
- Langeani, F., Lucena, Z.M.S., Pedrini, J. & Tarelho-Pereira, F.J. 2005b. *Bryconamericus turiuba*, a new species from the upper rio Paraná system (Ostariophysi: Characiformes). *Copeia* 2005(2):386-392.
- Latrubesse, E.M., Stevaux, J.C., Santos, M.L. & Assine, M.L. 2005. Grandes sistemas fluviais: geologia, geomorfologia e paleohidrologia. In *Quaternário no Brasil* (C.R.G. Souza, K. Suguio, A.M.S Oliveira & P.E. Oliveira, eds.). Editora Holos, Ribeirão Preto, p. 276-297.
- Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (2001). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 603 p.
- Montoya-Burgos, J.I., Muller, S., Weber, C., Pawlowski, J. (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) basen on mitochondrial rRNA gene sequences. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 363-375.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris-Jr., C.J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre : EDIPUCRS. 742 p.
- Reis, R. E., Pereira, E. H. L. and Armbruster J. W. (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147, 277–299.
- Santos, G.M. & Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da bacia amazônica. In *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais* (R.H. Lowe- McConnell). Edusp, São Paulo, p. 345-373.
- Stoeckle M(2003) Taxonomy, DNA and the bar code of life. *BioScience* 53: 2–3.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B* doi: 10.1098/rstb.1716.
- Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.